

# 再生軟骨の三次元培養を応用した脱細胞化基質の作製と足場素材としての有用性の検討

著者	渡邊 智彦
号	87
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3800号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00124212">http://hdl.handle.net/10097/00124212</a>

氏 名	ワタナベ トモヒコ 渡邊 智彦
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成30年3月27日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)小児外科学 専攻
学位論文題目	再生軟骨の三次元培養を応用した脱細胞化基質の作製と足場素材としての有用性の検討
論文審査委員 主査	教授 仁尾 正記 教授 後藤 昌史
	教授 小笠原 康悦

## 論文内容要旨

＜背景＞軟骨は血管やリンパ組織を欠き、大部分を細胞外基質が占める構造を持つ。物質交換性が低いために組織修復能力が乏しく、一度構造の破綻を来すと自ら再生することが困難である。そのため、軟骨損傷の治療として再生医療が注目を集めており、自家軟骨細胞移植が広く応用されているが、軟骨細胞は平面培養を行うと脱分化してしまい、基質産生能を失ってしまうという問題点がある。平面培養により一旦脱分化した軟骨細胞が再分化するためには、三次元構造を維持して培養する必要がある。そのため軟骨細胞を保持可能な足場素材の研究が進められているが、生体適合性、力学的強度、軟骨細胞の支持、分化促進能を十分に併せ持つ足場素材はまだ開発途上である。これを解決する方法として、生体の微小環境を保持した脱細胞化組織の利用が検討されているが、入手性や形状の制限など課題は多い。一方、軟骨細胞を *in vitro* で三次元培養することで軟骨基質を産生させ、その再生組織に脱細胞化の処理を加えることができれば、任意の三次元構造をもった軟骨基質を容易に得ることが可能となる。再生軟骨組織から得られた軟骨基質は、合成物や他家由来の生体軟骨基質を使用するより免疫原性の低い、安全性の高い組織であり、理想的な足場素材として機能することが期待される。

＜目的＞再生軟骨組織から基質を取り出す脱細胞化処理の方法を確立し、さらに得られた脱細胞化組織の足場素材としての有用性を示すこと。

＜方法＞ヒト耳介より取り出した軟骨細胞を、DMEM/F12 に 5%血清、インスリン、FGF-2 を添加した細胞増殖培地を用いて 1 週間平面培養した後、0.5%アテロコラーゲンに  $1.0 \times 10^7$  cells/ml の濃度で包埋し、体積  $100 \mu\text{l}$  の組織片を作製した。この組織片に対して DMEM/F12 を用いた基礎培地、基礎培地に IGF-I を添加した分化誘導培地、細胞増殖培地の 3 種類を用いて 3 週間の三次元培養を行い、基質産生の度合いを比較検討した。次に、三次元培養再生軟骨組織に Detergent enzyme method (DEM:4%デオキシコール酸溶液中で振盪させ 3 時間で細胞膜を融解し、DNase-I 溶液中で振盪させて 3 時間で核を除去する方法) を施行し、その cycle 数を変化させて脱細胞化処理の最適な方法を検討した。続いて、最適化した方法により調製した三次元培養再生軟骨の脱細胞化組織を足場素材として、別の患者由来のヒト耳介軟骨細胞を播種し、基礎培地と増殖培地を用いて、軟骨細胞の成熟と基質産生の度合いを検討した。また、ヒト耳介軟骨細胞再挿入組織を nude マウスの皮下に移植して生体内での軟骨成熟を検討した。さらに、マウス耳介軟骨細胞を用いて同様の再挿入組織を作製して免疫正常マウスに移植し、脱細胞化組織のアログラフトとしての有効性を検討した。最後に、脱細胞化組織を作製した細胞と異種の細胞を播種し、ジェノグラフトとしての再挿入組織が作製可能か否かを検討した。

＜結果＞分化誘導培地を用いて三次元培養を行うことで、軟骨基質の豊富な三次元培養再生軟骨組織が作製可能であった。DEMによる脱細胞化処理では、生体内の軟骨組織では5 cycles以上を要するとの報告のあった脱細胞化の処理が、再生軟骨組織では1 cycleで十分な核の脱落の所見が得られることがわかった。また、DEMのcycleを繰り返しても、組織内のGAG量は減少せず、脱細胞化の処理による基質構造の破綻は見られなかった。脱細胞化組織に別の患者由来のヒト軟骨細胞を播種して培養を行ったところ、細胞増殖培地を用いることで、軟骨細胞は穿刺部と周辺部から脱細胞化組織内部へと侵入、生着し、あらたな軟骨基質を産生することが確認できた。これをnudeマウスの皮下に移植して生体内での軟骨組織の成熟を検討したところ、脱細胞化基質への細胞再挿入組織は、三次元培養再生軟骨組織と同様に成熟し、あらたな基質の産生を確認できた。基質のアログラフトとしての有用性検討のためにC57BL/6マウス耳介軟骨細胞で作製した脱細胞化組織にBALB/cマウス耳介軟骨細胞を播種してBALB/cマウスに移植したところ、良好な軟骨成熟が得られた。また脱細胞化組織に異種動物の軟骨細胞を播種して培養したところ、異種の細胞では生着は不十分で、足場素材としては有効に作用しなかった。

＜結論＞再生軟骨の三次元培養により産生された軟骨基質は、生体の軟骨に比べて容易に、基質を破壊することなく脱細胞化可能であることがわかった。また、脱細胞化組織に同種の別個体の軟骨細胞を播種することで、細胞の生着とあらたな基質産生がみられ、足場素材としての有用性がみとめられた。再生軟骨の基質を足場素材として用いることで、より免疫原性の低い、生体に安全な軟骨移植の方法の確立に寄与することが期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 再生軟骨の3次元培養を応用した脱細胞化基質の作製と足場素材としての有用性の検討

所属専攻・分野名 医科学専攻・小児外科学分野

学籍番号 B4MD5132 氏名 渡邊 智彦

軟骨は血管やリンパ組織を欠き、組織修復能力が乏しく、一度構造の破綻を来すと自ら再生することが困難である。軟骨損傷の治療として再生医療が注目を集めており、自家軟骨細胞移植が広く応用されているが、軟骨細胞の基質産生能を維持するために三次元構造を維持して培養する必要がある。細胞を担持する足場素材の研究が進められているが、生体適合性、力学的強度、軟骨細胞の支持、分化促進能を十分に併せ持つ足場素材はまだ開発途上である。これを解決する方法として、生体の微小環境を保持した脱細胞化組織の利用が検討されているが、入手性や形状の制限など課題は多い。本研究では、再生軟骨組織から脱細胞化組織を得て、足場素材として使用することが出来るかを検討した。はじめに再生軟骨組織に Detergent Enzyme Method(DEM)を用いて脱細胞化処理を行ったが、生体軟骨での報告よりも短時間で容易な脱細胞化処理が可能であることがわかった。得られた脱細胞化組織に別個体のヒト耳介軟骨細胞を脱細胞化組織に再挿入し、培養を行ったところ、基質への生着と成熟の傾向がみられ、生体内でも組織の成熟がみられた。基質のアログラフトとしての有用性検討のため、マウスに対して、他家で作製した脱細胞化基質に自家細胞を再挿入した再生軟骨組織を作製し移植したところ、良好な軟骨成熟が得られた。また脱細胞化組織に異種動物の軟骨細胞を播種して培養したところ、異種の細胞では生着は不十分で、足場素材としては有効に作用しなかった。

再生軟骨の三次元培養により産生された軟骨基質は DEM にて、生体の軟骨に比べて容易に、基質を破壊することなく脱細胞化可能であることがわかった。また、脱細胞化組織に同種の別個体の軟骨細胞を播種することで、細胞の生着とあらたな基質産生がみられ、足場素材としての有用性がみとめられた。再生軟骨から得られたアログラフトとしての脱細胞化組織は、事前にバンク化することも可能で、任意の三次元構造をもたせることが可能であり、合成物や他家由来の生体軟骨基質より免疫原性の低い、生体にとって安全性の高い、理想的な足場素材として機能することが期待される。

以上、本論文で示された結果は、軟骨再生技術の臨床応用に向けて、学術的に大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。